

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程進学
氏 名 清水 崇史
指導教員名 山根 久和

論文題目 イネの病害抵抗性発現におけるジャスモン酸の機能の解析

植物は病原体に感染した場合、病原体の細胞表層由来の成分等がエリシターとなり、それが細胞膜上の受容体と特異的に結合することで病原体の感染を認識する。そして、これが引き金となってジャスモン酸 (jasmonic acid, JA) 等の二次シグナル物質の生産が誘導されると共に、抗菌性タンパク質の発現や、ファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産など様々な抵抗性反応が誘導される。JA は植物の老化、花器官の成熟、離層の形成等の成長生理現象だけでなく病虫害抵抗性にも関わる植物ホルモンとして、植物界に広く分布していることが知られている。植物の病害抵抗性発現における JA の機能についてはシロイヌナズナを中心とした研究により、JA が主に死体栄養性を示すカビなどに対する抵抗性の発現において重要な機能を有していることが示されている。

一方、イネでは JA の生合成やシグナル伝達に関わる遺伝子は、シロイヌナズナで得られた知見をもとにした逆遺伝学的な手法で徐々に明らかにされつつあるが、個々の詳細な解析は行われていない。イネの代表的な病害抵抗性反応の一つであるファイトアレキシン生産は、イネに JA や JA 生産を誘導するエリシターを処理することで誘導されることから、JA はイネのファイトアレキシン生産において重要な機能を担っていると考えられてきた。しかしながら、最近まで有用なイネの JA 生合成変異株が得られていなかったため、ファイトアレキシン生産を含め、イネの病害抵抗性発現における JA の役割について詳細な解析は行われていなかった。また、最近、イネにおいても JA 生合成に関わると考えられる allene

oxide cyclase 遺伝子(AOC)の変異株である *hebiba* や *cpm2*、JA の活性型と考えられる JA-Ile の生合成に関わる *JAR1* の変異株 *osjar1* が得られているが、いずれも光形態形成の表現型に基づいて取得されたものであり、これらの変異体についてもストレス応答や病害抵抗性発現に注目した解析はほとんど行われていない。

そこで本研究では、これら変異株の詳細なキャラクタリゼーションを行うと共に、これらを用いて、ファイトアレキシン生産についての解析や病害抵抗性試験を行うことで、イネの病害抵抗性発現における JA の機能を解明する事を目的とした。またその過程でイネのフラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンの生合成酵素である naringenin O-methyltransferase (NOMT)の活性が JA 依存的に誘導されることを見出されたので、この JA によるサクラネチン生合成制御機構解明の足がかりとするため NOMT の単離・同定を試みた。

イネの JA 生合成変異株 *cpm2* 及び *hebiba* のキャラクタリゼーションとこれら変異株を用いた病害抵抗性発現における JA の機能の解析

cpm2 や *hebiba* における JA 生産能について、傷害処理後の葉において蓄積する JA を定量することで調べた。その結果 *cpm2* や *hebiba* では野生型株と比較して顕著に JA や JA-Ile の蓄積量が低下した。また JA のキラル分析を行うことにより、*cpm2* や *hebiba* でわずかに検出される JA は、非酵素的に生成されたものであることが示唆された。以上の結果から *cpm2* や *hebiba* は強い JA 欠損変異株であることが示された。また、JA 応答性遺伝子について発現解析を行ったところ、JA 処理時には *cpm2* や *hebiba* においても野生型株と同程度にまで発現が誘導されたが、傷害処理時には *cpm2* や *hebiba* ではこれらの遺伝子の発現は顕著に低下しており、*cpm2* や *hebiba* では JA 欠損により、JA 応答性遺伝子の発現が低下していることが示された。次に *cpm2* を用いて JA 及び塩化銅エリシター処理時のファイトアレキシン生産についての検討を行った。その結果、JA 処理時にはいずれのファイトアレキシンについても野生型株と *cpm2* とで同等のファイトアレキシン生産を示したが、塩化銅処理時には、サクラネチンの蓄積は *cpm2* で顕著に低下しており、サクラネチン生合成に関与する NOMT 活性も、野生型株と比較して *cpm2* で顕著に低下していた。しかし意外なことに、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産は野生型株と *cpm2* とで同等であった。以上の結果からイネのファイトアレキシン生産において JA は、サクラネチンの生合成には必須であるが、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産には JA 非依存的な誘導系も存在することが示唆された。また更に、*cpm2* や *hebiba* を用いたいもち病菌接種試験も行った。イネの葉鞘に非親和性いもち病菌の孢子懸濁液を注入し、接種後 2 日における菌糸の侵入を観察したところ、野生型株に比べ *cpm2* や *hebiba* では多細胞にわたり菌糸の伸展が観察される割合が増加し、さらにイネに JA を事前に処理しておくことでいもち病菌の侵入率が低下することが示された。いもち病菌接種時における JA の蓄積について野生型株を用いて検討したところ、いもち病菌接種による有意な JA の蓄積は見出されなかったものの、JA 応答

性遺伝子のプロモーターの制御下で GFP を発現させるようなコンストラクトを用いて形質転換したイネに対するもち病菌接種を行うことで、菌糸の侵入部位付近で微弱な GFP による蛍光が観察されたため、もち病菌感染時には感染部位局所的に JA の生産が誘導されていることが示唆された。また、もち病菌をイネ葉身に噴霧した際に観察される病斑は、野生型株に比べ *cpm2* や *hebiba* で大きくなることが示された。以上の結果から、JA はもち病菌のイネへの侵入や菌糸の伸展を抑制することに関与しているものと考えられる。

イネの JA-Ile 生合成変異株 *osjar1* のキャラクターゼーションと *osjar1* を用いた病害抵抗性発現における JA-Ile の機能の解析

シロイヌナズナにおいては、近年、COI1 を中心とした JA シグナル伝達系において JAR1 によって JA から生合成される JA-Ile が活性本体であることが示されている。一方で JA 生合成中間体である OPDA や JA-Ile 以外の JA 類縁体が COI1 非依存的な機能を有することも示されつつある。そこで、イネの *JAR1* 遺伝子である *OsJAR1* の変異株 *osjar1* のキャラクターゼーションを行い *OsJAR1* の機能について知見を得ると共に、この株を用い、*cpm2* や *hebiba* で観察されてきた JA 欠損による表現型についても調べることで、イネの病害抵抗性発現における JA-Ile の機能について追究することとした。

osjar1 の葉に対し傷害処理を行った際の JA 及び JA-Ile の蓄積を定量したところ、JA の蓄積量は野生型株以上であったのに対し、JA-Ile の蓄積は野生型株と比較して顕著に低下していた。そこで JA 応答性遺伝子について発現解析を行ったところ、傷害処理、JA 処理のいずれにおいても *osjar1* では野生型株と比較して、それらの発現が顕著に低かった。また JA-Ile の蓄積量の低下と JA 応答性遺伝子の発現量の低下は、*osjar1* において *OsJAR1* を恒常的に発現させることで相補されることが示された。以上の結果から、イネにおいても *OsJAR1* が JA-Ile の生合成に関与しており、JA-Ile が JA シグナル伝達において重要な機能を果たすことが示された。そこで *osjar1* に対して JA、JA-Ile 処理を行った際のファイトアレキシンの蓄積について検討したところ、ジテルペン型ファイトアレキシン、サクラネチン共に JA 処理時には野生型株と比較して顕著に蓄積が低下した一方、JA-Ile 処理時には *osjar1* においても野生型株と同等の蓄積が観察された。以上の結果から JA 誘導によるファイトアレキシンの生産には JA-Ile が必要であることが示された。最後に *osjar1* におけるもち病菌接種実験を行った。非親和性もち病菌を *osjar1* の葉身に噴霧した際の病斑の大きさを野生型株と比較したところ、*osjar1* では形成される病斑が野生型株に比べわずかではあるが有意に大きくなることが示された。以上の結果から、先に示されたいもち病菌の菌糸の侵入・伸展の抑制における JA の関与には JA-Ile が介していることが考えられた。

サクラネチン生合成酵素 NOMT の単離・同定

NOMT の精製は Rakwal らにより試みられていた(Rakwal et al., (2000) *Plant Sci.*, 155, 213-221; Lin et al., (2006) *J. Pestic. Sci.*, 31(1), 47-53)が、その時は主要な NOMT 活性画分

からは、少なくとも大腸菌を用いた組み換え酵素では NOMT 活性を示さない caffeic acid O-methyltransferase (COMT)である OsCOMT1 が得られていた。そこで本研究では、まず OsCOMT1 がイネ内生において NOMT 活性に関与しているかどうかを、OsCOMT1 変異株 (*oscomt1*)を用いることで調べることにした。

oscomt1 において OsCOMT1 の発現が低下していることを確認した上で、*oscomt1* に対し塩化銅処理を行った際のサクラネチンの蓄積を定量したところ、野生型株と同等のサクラネチンの蓄積が観察された。また同様に *oscomt1* における NOMT 活性及び COMT 活性の比較を行ったところ、野生型株と比較して COMT 活性は低下していたものの、NOMT 活性は同等であった。以上の結果から OsCOMT1 は NOMT 活性を有さないことが示された。そこで、この *oscomt1* を用いて酵素精製を行うことで NOMT の単離・同定を試みることにした。NOMT 活性を指標に、UV 処理を行った約 200 g の *oscomt1* の葉身から粗酵素抽出液を調製し、硫酸塩析、陰イオン交換による精製、adenosine-agarose を担体とするアフィニティー精製を順次行うことで、粗酵素抽出液から約 400 倍 NOMT 活性を濃縮することができた。そこでこの活性画分を SDS-PAGE に供したところ、NOMT 活性を最も効率的に濃縮できたアフィニティー精製後に初めて観察される約 40 kDa のバンドが検出された。このバンドを切り出し MALDI-TOF/TOF を用いた PMF 解析に供したところ、イネゲノム上の Os04g0175900 及び Os12g0240900 にそれぞれコードされる 2 つの O-methyltransferase と推測されるタンパク質が見出された。当研究室で既に行われていたマイクロアレイ解析結果を参照すると、イネの葉において Os12g0240900 は JA 処理により顕著に発現の誘導される遺伝子、Os04g0175900 は JA による誘導はなく発現量も比較的低い遺伝子であることが推察された。今後は、これら得られたタンパク質の機能解析を行い、サクラネチン生合成への関与を明らかにしていく必要があると考えている。

まとめ

本博士論文研究では *hebiba*、*cpm2*、*osjar1* といった JA 生合成変異株を用いた解析により、イネの病害抵抗性反応の一つであるファイトアレキシン生産において、サクラネチン生産には JA が必須であるが、ジテルペン型ファイトアレキシン生産においては JA 依存性・非依存性のシグナル伝達系が存在することを示した。また、いもち病菌の侵入や菌糸の伸展に関する抵抗性に JA が寄与していることを示した。この JA 依存性の抵抗性反応には JAR1 によって生合成される JA-Ile が活性型 JA として機能している可能性も示唆された。更に、JA 依存的な病害抵抗性発現機構解明の足がかりとして NOMT の単離・同定を試み、それにより 2 つの NOMT 候補遺伝子の取得がなされた。今後は特に NOMT 候補遺伝子の機能同定を行い、NOMT の JA による発現、活性化機構について調べることで、イネにおける JA による病害抵抗性発現の分子メカニズムの解明がなされることが期待される。